



Optimización biotecnológica para el enriquecimiento de vitamina B₁₂ en productos fermentados

Qiqi Li

Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal

Entidad: Europastry S.A.

Directora del Trabajo: Marina Diana Pérez

Tutor del trabajo: Manuel Castillo Zambudio

Barcelona, 20 de Julio de 2018

Marina Diana Pérez, responsable de los proyectos científico-técnicos de la empresa Europastry S. A., y Manuel Castillo Zambudio, Profesor Agregado del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona:

INFORMAN

Que el trabajo titulado: "**Optimización biotecnológica para el enriquecimiento de vitamina B₁₂ en productos fermentados**" ha sido realizado por Qiqi Li bajo supervisión o tutela de los Sres. Manuel Castillo Zambudio y Marina Diana Pérez dentro del módulo Trabajo Fin de Máster del Máster Oficial de Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Fecha: 4 de julio , 2018

Marina Diana Pérez

Firma:

Manuel Castillo Zambudio

Firma:

Lista de abreviaturas

DMBI	5,6-dimetilbencimidazol
PF	<i>Propionibacterium Freudenreichii</i>
CNTA	Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria
LP	<i>Lactobacillus Plantarum</i>
ESI	Ionización por electrospray
UHPLC	Ultra-high-pressure liquid chromatography
DAD	Diode Array Detector
PB7-60%	Pan con 60% de masa madre optimizada
PB7-100%	Pan con 100% de masa madre optimizada
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Índice

1. Introducción	1
1.1 Objetivos	2
2. Materiales y Métodos	3
2.1 Medios y reactivos	3
2.2 Microorganismos	3
2.3 Cultivo y Recuentos de <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	3
2.4 Determinación de parámetros óptimos durante la fermentación	4
2.5 Determinación de cianocobalamina (vitamina B ₁₂) en masa madre por UHPLC- DAD- MS	6
2.6 Panificación	7
2.7 Evaluación sensorial	8
3. Resultados y Discusión	9
3.1 Recuentos de <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	9
3.2 Contenido de cianocobalamina (vitamina B ₁₂) en la masa madre	10
3.2 Contenido de cianocobalamina (vitamina B ₁₂) en el producto final (pan)	12
3.4 Evaluación sensorial	13
4. Conclusiones	14
Bibliografía	

Resumen

La vitamina B₁₂, también llamada cianocobalamina, es una vitamina hidrosoluble relacionada con el funcionamiento del sistema hematopoyético, neurológico y cardiovascular. Aunque la vitamina B₁₂ es una vitamina que se puede encontrar en la mayoría de los alimentos de origen animal, su deficiencia humana todavía ocurre en muchos países, principalmente debido a la malnutrición causada no sólo por la ingesta insuficiente de alimentos, sino también debido a las dietas desequilibradas. Vegetarianos y ancianos son propensos a sufrir deficiencia de vitamina B₁₂. Algunos microorganismos, como *Propionibacterium freudenreichii*, pueden sintetizar vitamina B₁₂. En este estudio, para obtener el enriquecimiento natural de vitamina B₁₂ en alimentos fermentados (masa madre panaria), se inoculó la cepa *Propionibacterium freudenreichii* en un biorreactor, y se diseñaron diferentes *batches* (lotes) para encontrar las condiciones óptimas de producción de vitamina B₁₂. Los resultados mostraron que la masa madre inoculada con una concentración elevada de *Propionibacterium freudenreichii* ($2,75 \cdot 10^{17}$ UFC) suplementado con lactato y fermentada a 30°C durante 48 horas en el biorreactor bajo condiciones controladas de pH produjeron el contenido más alto de cianocobalamina (3,12 µg/100 g).

Intruducción

La Vitamina B₁₂ o cianocobalamina es una vitamina hidrosoluble ampliamente utilizada como suplemento alimentario y es particularmente importante en el tratamiento de la anemia perniciosa. La vitamina B₁₂ es muy importante para la función normal del sistema nervioso y para la formación de sangre, estando también involucrada en la síntesis y regulación de DNA y ácidos grasos así como en la producción de energía (1).

La vitamina B₁₂ se describe como un compuesto muy complejo de estructura específica que contiene un núcleo de corrina en torno a un ion central de cobalto. El anillo de corrina está formado por cuatro heterocíclicos aromáticos con cobalto en el centro del anillo, lo que explica su nombre científico, cobalamina (2). La vitamina B₁₂ tiene cuatros anillos pirrólicos cobalamina con un ligando inferior común de 5,6-dimetilbencimidazol (DMBI) en la posición- α y uno de los cuatros ligandos superiores (adenosilo, metilo, hidroxilo o ciano) en la posición- β (**Figura 1**) respectivamente, llamadas adenosilcobalamina (AdoCbl), metilcobalamina (MeCbl), hidroxicobalamina (OHCbl) y cianocobalamina (CNCbl).

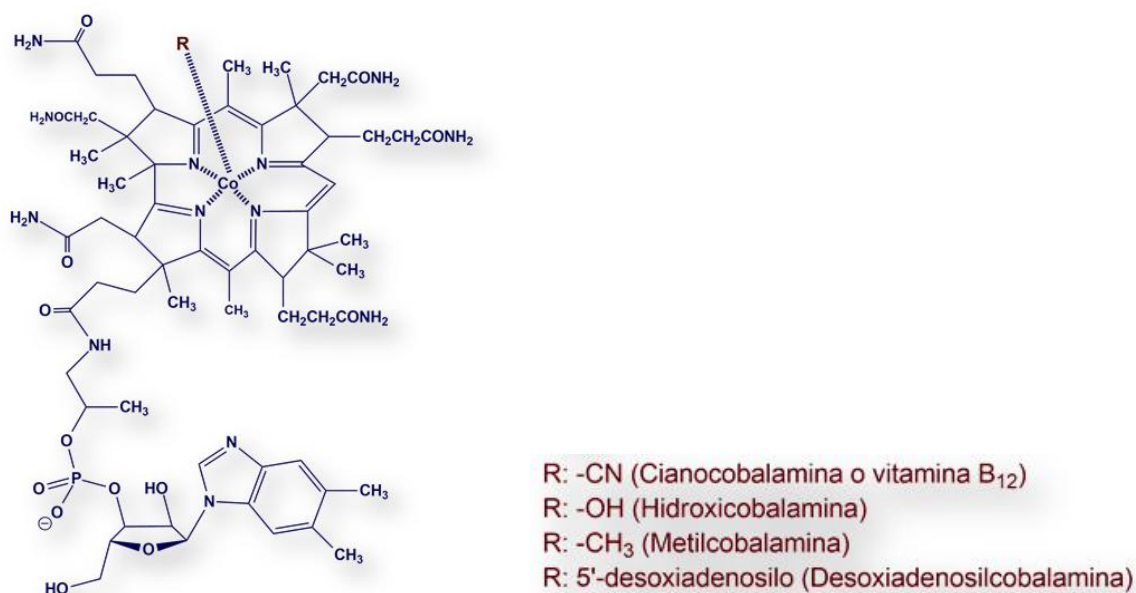


Figura 1. Estructura de la cobalamina y sus diferentes formas, según origen.

La vitamina B₁₂ con DMBI como el ligando inferior es una cobalamina activa para humanos. Otras cobalaminas tienen una estructura idéntica a la vitamina B₁₂ pero con un ligando inferior diferente, son sintetizadas por microorganismos y se definen como análogos de

vitamina B₁₂. El ligando DMBI de B₁₂ es esencial para su absorción y bioactividad en humanos (3).

La Ingesta Diaria de Referencia de la cianocobalamina es de 2,4 µg/día. Los humanos no pueden sintetizar vitamina B₁₂ pero tienen requisitos nutricionales y la obtienen principalmente de alimentos derivados de animales, como leche, carne, huevos y sus productos. El mayor contenido de vitamina B₁₂ se encuentra en el hígado (p. ej., el hígado de vaca contiene 83,1 µg/100 g) (4)(5). Los alimentos de origen vegetal carecen de vitamina B₁₂ a menos que estén contaminados o procesados con microorganismos capaces de sintetizar vitamina B₁₂ (6). Por ejemplo, el *tempeh* contiene aproximadamente 0,18-8 µg/100 g de vitamina B₁₂ (7). A nivel mundial, los vegetarianos y veganos suelen estar en riesgo de deficiencia de vitamina B₁₂.

Las bacterias más favorables para la producción industrial de vitamina B₁₂, debido a su estado generalmente reconocido como seguro (GRAS, del inglés *Generally Recognised As Safe*) y su capacidad para sintetizar formas activas de este metabolito, son las cepas de *Propionibacterium freudenreichii* (8). Los experimentos *in vivo* confirmaron que la síntesis de DMBI en *P. freudenreichii* requiere oxígeno (9), como en los microorganismos aerobios (10)(11), lo que conduce a la producción de las formas activas de vitamina B₁₂. Además de *P. freudenreichii* existen también algunas bacterias lácticas como *Lactobacillus reuteri* que han sido utilizadas en intentos de aumentar los niveles de vitamina B₁₂ en productos alimenticios a través de la fermentación (12). Existen además varias especies de *Lactobacillus* (13) como *L. reuteri* (14), *L. plantarum* (16) y *L. rossiae* (17), de las que también se ha demostrado que son capaces de generar cianocobalamina.

1.1 Objetivos

El objetivo de este estudio es la optimización biotecnológica para el enriquecimiento natural de vitamina B₁₂ en productos fermentados (masa madre panaria) mediante el uso y aplicación industrial de cepas del género Actinobacteria (*Propionibacterium freudenreichii*) cuya acción fermentativa enriquezca a productos finales en esta vitamina.

2 Material y Métodos

2.1 Medios y reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. El extracto de levadura, el lactato sodio, el lactato líquido (50%), la cianocobalamina, el ácido acético, el ácido fórmico LC-MS, la takadiastasa, la pepsina, la caseína peptona y el agar fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El medio MRS y el agar MRS se compraron en Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia). El KHCO_3 de PanReac Applichem (Castellar del Vallés, Barcelona). La harina de trigo integral se compró en Harinas Polo (Zaragoza).

2.2 Microorganismos

Para la optimización de producción de vitamina B₁₂ en masa madre durante de la fermentación, se utilizaron dos cepas: *Propionibacterium freudenreichii* y *Lactobacillus plantarum*, ambas obtenidas del Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria, (CNTA, Navarra). *P. freudenreichii* se usó como cepa principal del estudio mientras que *L. plantarum* se usó como control experimental para la inoculación secuencial.

2.3 Cultivo y recuentos de *Propionibacterium freudenreichii*

De acuerdo con la formulación propuesta por la casa comercial Sigma, el medio de cultivo para *P. freudenreichii* se elaboró con un 10% de caseína peptona, un 5% de extracto de levadura, un 10% de lactato sólido y agua destilada. Para el medio sólido se añadió a la formulación anterior un 15% de agar microbiológico. Después de agitar y disolver completamente todos los ingredientes, se dispensaron 20 ml del medio líquido en tubos falcon y se autoclavaron a 121 °C durante 15 min. Para cada batch diseñado se usaron dos tubos falcon a los que se añadieron dos criobolas de *P. freudenreichii* en cada tubo y se incubaron en la estufa a 30 °C durante 48h.

Posteriormente, se agitaron y vortearon hasta su completa homogeneización para realizar un máximo de 11 diluciones seriadas en agua de peptona y se sembraron por inmersión las 3 últimas diluciones en placas de Petri con medio de cultivo de *P. freudenreichii* agar, previamente fundido. Una vez solidificado el agar, se incubaron las placas en una jarra de

anaerobiosis a 30 °C durante 48 h. En las placas de agar que mostraron crecimiento, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/g) utilizando un contador de colonias.

2.4 Determinación de parámetros óptimos durante la fermentación

Para la realización de las diferentes pruebas de masas madre panaria líquida se usó un biorreactor de 5L (Biostat A plus, Sartorius, Alemania). Para determinar los parámetros óptimos durante la fermentación en el biorreactor, se diseñaron 8 batches (lotes) diferentes que se muestran en la **Tabla 1**.

Se prepararon dos tubos falcon con medio de cultivo y se depositaron 2 criobolas en cada uno. Tras incubarlos durante 48 h a 37 °C, se centrifugaron, se decantó el medio y se lavó el pellet cuidadosamente con agua destilada estéril, evitando que se desprendiera del fondo del tubo. Luego, en cada tubo se resuspendieron 20 mL de agua destilada para mezclar con el pellet y se vorteoó durante unos segundos. Se llenó el bioreactor con los ingredientes y las cepas y se dejó fermentar durante 48 h a 30 °C. Durante la fermentación, se estableció una agitación continua a 100 rpm y el pH se controló a ~5,5 utilizando la adición continua de KHCO_3 2,5 M. El valor de pH inicial de la masa madre era de entre 6,0 y 6,2, sin embargo, pero durante los procesos de la producción de vitamina B₁₂ por *Propionibacterium freudenreichii*, debido al consumo continuo del sustrato durante las primeras 24 horas de fermentación, posiblemente se pudiera generar una gran cantidad de ácido propiónico, lo que reduciría rápidamente el valor de pH y afectaría la producción de vitamina B₁₂. [\(8\)](#)

La inoculación secuencial consistió en inocular *P. freudenreichii* al inicio de la fermentación durante 24 horas y posteriormente añadir *L. plantarum* hasta finalizar el proceso fermentativo (48 h).

Tabla 1. Diseño experimental de los batches.

Número	Nombre	Ingredientes (g)			Cepas		Tiempo
		Harina	Agua	Lactato	Propionibacterium freudenreichii	Lactobacillus Plantarum	
0	Control	800	3200	-	-	-	48 h
1	PF	800	3200	-	x	-	48 h
2 ^a	PF suplementado con lactato	800	3200	10 g	x ^d	-	48 h
3	PF+LP	800	3200	-	x	x	48 h
4	Inoculación Secuencial	800	3200	-	x	x	48 h
5 ^b	PF suplementado con lactato	1200	2800	54 ml	x	-	48 h
6	PF fermentacion corta	800	3200	-	x	-	24 h
7 ^c	PF suplementado con lactato	800	3200	80 ml	x	-	48 h

^aEl Batch 2 consistió en una fermentación con inóculo de PF suplementado con lactato de sodio al 100%

^{b,c} el Batch 5 y el Batch 7 eran fermentaciones de inóculo PF suplementado con lactato líquido al 50%.

^dLa x indica presencia de cepa en el batch.

2.5 Determinación de vitamina B₁₂ en masa madre por UHPLC- DAD- MS

Para el análisis del extracto para la determinación por UHPLC-DAD-MS se optimizó un método cromatográfico basado en una elución en gradiente, mediante agua Milli Q al 0,1% HCOOH (Solvente A) y acetonitrilo (Solvente B) como fase móvil (**Tabla 2**). El volumen de inyección fue de 20 µL (4 °C), la temperatura de la columna 30 °C y el flujo de 0,5 mL/min.

El detector de absorbancia UV/visible (diode array detector, DAD) registró entre 200-600 nm siendo los máximos de absorbancia para la cianocobalamina 362 nm y 550 nm.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para el UHPLC-DAD-MS.

Tiempo (min)	%A	%B
0.00 min	95.00	5.00
6.00 min	80.00	20.00
10.00 min	20.00	80.00
11.00 min	1.00	99.00
13.00 min	1.00	99.00
13.20 min	95.00	5.00

La detección de la cianocobalamina por espectrometría de masas se llevó a cabo con una fuente de ionización mediante electrospray (ESI) operando con los parámetros descritos en la **Tabla 3** (comunes en ambos espectrómetros de masas). Las transiciones de MRM optimizadas para el método MS/MS utilizado en el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo se resumen en la **Tabla 4**. Para el espectrómetro de masas TOF se adquirió en modo Scan entre 500 y 1700 m/z a 3 scan /s.

Tabla 3. Parámetros de adquisición per UHPLC-(+)ESI-MS.

Parámetro	Cianocobalamina (ESI(+))
Gas Temp (°C)	225
Gas Flow (l/min)	14
Nebulizer (psig)	50
SheathGasTemp(°C)	400
SheathGasFlow (l/min)	12
Gas Temp (°C)	225
Capillary voltaje (V)	3000

Tabla 4. Las transiciones de adquisición por UHPLC-((+)ESI)QQQ.

Compuesto	tr (min)	Ion precursor	Ion producto	CE (V)	Tipo transición
Cianocobalamina	4.9	1356.1	1209.8	40	Quantitativa
(Vitamina B ₁₂)		678.4	3591	20	Qualitativa
		678.4	147	40	Qualitativa

2.6 Panificación

Una vez obtenida la masa madre optimizada en el biorreactor, se elaboraron 3 panes de diferente porcentaje de masa madre optimizada en una panificadora doméstica (Moulinex, Alençon, Francia). La Tabla 5 muestra las formulaciones seguidas para la elaboración de los panes.

Se seleccionó un programa de pan básico (2 horas y 57 minutos) y una vez enfriado y desmoldado, se procedió a extraer y cuantificar la vitamina B₁₂.

Tabla 5. Receta de los panes

Receta	Pan control	PB7-60% ^a	PB7-100% ^b
Ingredientes	Peso (g)	Peso (g)	Peso (g)
Masa Madre	0	300	500
Sal	10	10	10
Agua	400	150	0
Harina	200 (blanca) 300 (integral)	500 (blanca)	500 (blanca)
Levadura Fresca	5	5	5
Mejorante MP4	2.5	2.5	2.5

^aPB7-60% es el pan que contiene un 60% (respecto el gramaje de la harina) de la masa madre optimizada (batch 7).

^bPB7-100% es el pan que contiene un 100% (respecto el gramaje de la harina) de la masa madre optimizada (batch 7).

2.7 Evaluación sensorial

Las muestras de pan se presentaron en rebanadas en orden aleatorio y se identificaron con códigos de 3 dígitos a un total de 13 catadores. Los panes con diferente contenido de masa madre (PB7-60%, PB7-100%) se dividieron en dos grupos, y se realizó un test triangular para dilucidar diferencias sensoriales entre los panes con distinto porcentaje de masa madre. El tri-test 1 se realizó con dos panes de la masa madre PB7-60% y un pan de la PB7-100%, y el tri-test 2 constó de dos panes de la masa madre PB7-100% y un pan de la PB7-60%.

3. Resultados y Discusión

3.1 Recuentos de *Propionibacterium freudenreichii*

La Tabla 6 muestra los recuentos totales en UFC/g de los inóculos ensayados en cada batch (1-7). Como se puede observar, a mayor volumen de inóculo mayores recuentos microbianos. Cuando el volumen de inóculo se incrementó de 40 ml a 2200 ml el recuento ascendió hasta 5 logaritmos decimales.

Tabla 6. Recuentos microbianos en función del volumen de inóculo ensayado en cada batch.

Nombre del BATCH	Volumen inóculo (mL)	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> (UFC total)
0: Control	0	-
1: PF	40	$>10^9$
2: PF suplementado con lactato	40	$2.01 \cdot 10^{13}$
3: PF+LP	40	$4.66 \cdot 10^{12}$
4: Inoculación Secuencial	40	$1.20 \cdot 10^{12}$
5: PF suplementado con lactato	30	$9.10 \cdot 10^{10}$
6: PF fermentacion corta	40	$2.63 \cdot 10^{12}$
7: PF suplementado con lactato	2200	$2.75 \cdot 10^{17}$

3.2 Contenido de cianocobalamina (vitamina B₁₂) en las masas madre

La **Tabla 7** muestra los resultados de las pruebas realizadas en las masas madres elaboradas en el biorreactor. En la masa madre sin inóculo (control) se obtuvo un contenido de cianocobalamina de 0,06 µg/100g. Este resultado evidencia la presencia de microorganismos en la propia harina y que crecen a lo largo de la fermentación.

Por otro lado, no hay prácticamente diferencia de concentración entre el batch 1 y el batch 6 (fermentación corta) lo que significa que 24 h de fermentación podrían ser suficientes.

Sin embargo, los resultados para el batch 3 y el batch 4 (inoculados con LP) muestran que el contenido de vitamina B₁₂ no aumentó, sino que fue menor que el batch 1 (inoculado solamente con *P. freudenreichii*) lo que significa que la aportación de LP fue no significativa.

Muchos estudios han indicado que la producción de vitamina B₁₂ utilizando *P. freudenreichii* requiere el consumo de suero de leche, lactosa, glucosamina o lactato. Estas sustancias, como fuentes de carbono, pueden proporcionar energía para *P. freudenreichii*, aumentando así la producción de vitamina B₁₂ [\(17\)](#). Por consiguiente, tanto el batch 2 como el batch 5 que fueron suplementados con lactato, mostraron niveles más altos de vitamina.

El último batch (7) optimizado contuvo 2200 ml de volumen de inóculo total y además fue suplementado con lactato con lo que la concentración de vitamina resultó ser la más alta (3.12 µg/100g).

Tabla 7. Contenido de cianocobalamina (vitamina B₁₂) de masa madre

Número	Nombre	pH		KHCO ₃ 2,5 M (mL)	Contenido de cianocobalamina (µg/100g de masa madre)
		Inicial	Final		
0	Control	6,2	5,45	280	0,06
1	PF	6	5,94	-	0,42
2	PF suplementado con lactato	6,24	5,45	360	1,56
3	PF+LP	6,2	5,45	300	0,27
4	Inoculación Secuencial	6,2	5,45	366	0,3
5	PF suplementado con lactato	6,04	5,59	330	0,5
6	PF fermentacion corta	6,05	5,44	200	0,47
7	PF suplementado con lactato	6,02	5,45	195	3,12

3.3 Contenido de cianocobalamina (vitamina B₁₂) de producto final (pan).

Como se observa, la **Tabla 8** muestra los contenidos de vitamina B₁₂ de los panes finales. Obviamente, debido a que no se agregó masa madre optimizada en el control de pan, éste no contiene ninguna vitamina B₁₂. Por otro lado, los contenidos de cianocobalamina entre el pan PB7-60% y el PB7-100% no presentan una diferencia significativa.

Sin embargo, de acuerdo con los resultados ya obtenidos en 3.2, el contenido de vitamina B₁₂ en ambos productos de pan se redujo en comparación con el contenido de vitamina B₁₂ en la masa madre optimizada (batch 7). Esta pérdida puede deberse al proceso del horneado.

Tabla 8. Contenido de cianocobalamina (vitamina B₁₂) de producto final (pan).

Nombre	Contenido de cianocobalamina (µg/100g de pan)
Pan control	0
PB7-60%	1.8
PB7-100%	2

3.4 Evaluación sensorial

El nivel de significación otorgado a este estudio fue del 5%. Por lo tanto, según las **Tablas 9** (reproducido de Sensory analysis — Methodology — Triangle test) para un total de 13 participantes fueron necesarias un mínimo de 8 respuestas correctas para establecer diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. (21)

Tabla 9 Triangle test for difference: critical number (minimum) of correct answers.

Table A.1 — Minimum number of correct responses needed to conclude that a perceptible difference exists based on a triangle test

<i>n</i>	<i>α</i>					<i>n</i>	<i>α</i>				
	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001		0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
6	4	5	5	6	—	27	12	13	14	16	18
7	4	5	5	6	7	28	12	14	15	16	18
8	5	5	6	7	8	29	13	14	15	17	19
9	5	6	6	7	8	30	13	14	15	17	19
10	6	6	7	8	9	31	14	15	16	18	20
11	6	7	7	8	10	32	14	15	16	18	20
12	6	7	8	9	10	33	14	15	17	18	21
13	7	8	8	9	11	34	15	16	17	19	21
14	7	8	9	10	11	35	15	16	17	19	22
15	8	8	9	10	12	36	15	17	18	20	22
16	8	9	9	11	12	42	18	19	20	22	25
17	8	9	10	11	13	48	20	21	22	25	27
18	9	10	10	12	13	54	22	23	25	27	30
19	9	10	11	12	14	60	24	26	27	30	33
20	9	10	11	13	14	66	26	28	29	32	35
21	10	11	12	13	15	72	28	30	32	34	38
22	10	11	12	14	15	78	30	32	34	37	40
23	11	12	12	14	16	84	33	35	36	39	43
24	11	12	13	15	16	90	35	37	38	42	45
25	11	12	13	15	17	96	37	39	41	44	48
26	12	13	14	15	17	102	39	41	43	46	50

NOTE 1 Values in the table are exact because they are based on the binomial distribution. For values of *n* not in the table, compute approximate values for the missing entries based on the normal approximation to the binomial as follows. Minimum number of responses (*x*) = nearest whole number greater than

$$x = (n/3) + z \sqrt{2n/9}$$

where

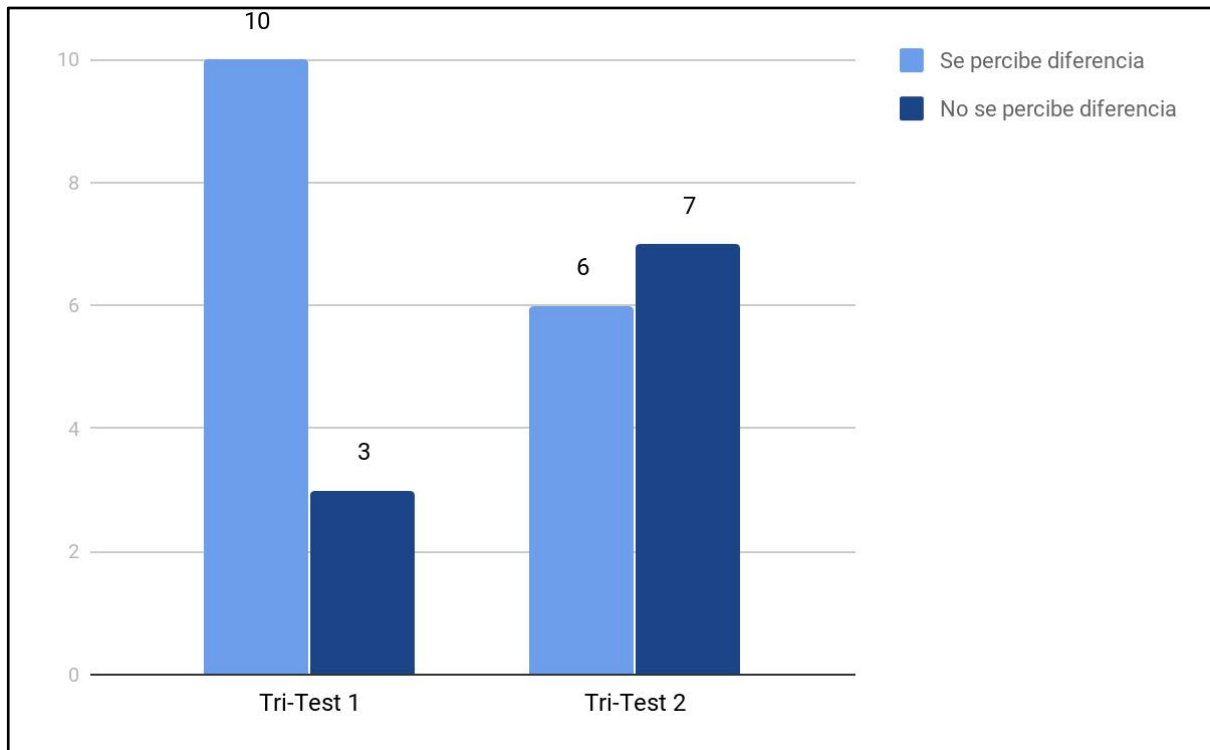
z varies with the significance level as follows: 0,84 for $\alpha = 0,20$; 1,28 for $\alpha = 0,10$; 1,64 for $\alpha = 0,05$; 2,33 for $\alpha = 0,01$; 3,09 for $\alpha = 0,001$.

NOTE 2 Values of *n* < 18 are usually not recommended for a triangle test for a difference.

NOTE 3 Adapted from Reference [11].

Como se observa en el **Gráfico 1**, en el tri-test 1, hubieron 10 personas que respondieron correctamente, por lo que se mostró la existencia de diferencias estadísticas entre PB7-60% y PB7-100%. En cambio para el tri-test 2 sólo 6 catadores consiguieron discriminar las muestras, con lo que no se pudo establecer diferencias significativas entre las muestras presentadas.

Gráfico 1. Resultados de Test Triangular.



4. Conclusiones

En los últimos años, muchos estudios han sugerido que tanto especies de *Lactobacillus* como *Propionibacterium freudenreichii* se usen como cepas productoras de vitamina B₁₂ con aplicación directa en la industria de alimentos fermentados. En este estudio, se comparó la producción de vitamina B₁₂ con el uso de *P. freudenreichii*, la inoculación secuencial con *Lactobacillus* y el uso *P. freudenreichii* suplementado con lactato mediante la fermentación en harina integral en un biorreactor piloto buscando las condiciones optimizadas para innovar en el desarrollo de nuevos productos enriquecidos naturalmente con Vitamina B₁₂. A través de los resultados, se puede observar que el nivel más alto de vitamina B₁₂ (3,12 µg/100g) de la masa madre es producido por *P. freudenreichii* suplementado con lactato. Cabe destacar que el volumen total de inoculación, el valor de pH durante la fermentación y el control de la temperatura de fermentación fueron también probablemente factores clave para el resultado obtenido.

Aburjaile et al., (2016) [\(19\)](#) indicaron que *P. freudenreichii* necesita glicógeno u otra fuente de carbono como recurso energético para la producción de vitamina B₁₂, y el lactato es una buena fuente de carbono. Sin embargo, la cantidad óptima de lactato añadido en el proceso de la fermentación se podría investigar en estudios futuros.

Marjorie G. et al., (2018) [\(20\)](#) indicaron que la vitamina B₁₂ (2 µg/100g) agregada como fortificante para la harina conserva una alta biodisponibilidad (60%) cuando se hornea en pan. En este estudio, se usaron diferentes contenidos de masa madre optimizada para proporcionar una concentración más alta de Vitamina B₁₂ en el producto final (pan). El resultado muestra que el pan PB7-100% contiene 2 µg/100g de cianocobalamina, es decir, este producto se puede aplicar a la industria para producir pan enriquecido en vitamina B₁₂.

Por otro lado, los panes con diferentes porcentajes de masa madre optimizada no muestran apenas diferencias en apariencia, textura, color y olor. En el futuro se podría investigar la mejora del sabor del pan agregando otros ingredientes con el fin de aumentar los atributos sensoriales y contribuyendo a la aceptación del producto final. También se podría generalizar el empleo del modelo desarrollado para evaluar el enriquecimiento de otro tipo de alimentos fermentados.

Bibliografia

- (1) Stabler, S.P. 2012. Vitamin B12 Present Knowledge in Nutrition, Tenth Edition. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. pp.343-359.
- (2) Yousef M. , Byong L. 2014. Capability of *Lactobacillus reuteri* to Produce an Active Form of Vitamin B12 under Optimized Fermentation Conditions. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*,ISSN: 2278-5213 :617-621.
- (3) Stupperich, E. and Nexø, E. 1991. Effect of the cobalt-N coordination on the cobamide recognition by the human vitamin B12 binding proteins intrinsic factor, transcobalamin and haptocorrin. *Eur. J. Biochem.* 199(2): 299-303.
- (4) Ball GFM. 2006. *Vitamins in foods: Analysis, bioavailability, and stability*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- (5) Stabler SP, Allen RH. 2004. Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annu. Rev. Nutr.* 24:299 – 326.
- (6) Watanabe F, Yabuta Y, Bito T, Teng F. 2014. Vitamin B12-containing plant food sources for vegetarians. *Nutrients* 6:1861 – 1873.
- (7) Watanabe F. 2007. Vitamin B12 sources and bioavailability. *Exp. Biol. Med.* 232:1266 – 1274.
- (8) Kamil P, Edyta L. 2018. Research on the ability of propionic acid and vitamin B12 biosynthesis by *Propionibacterium freudenreichii* strain T82. *Antonie van leeuwenhoek*.2018 Jun;111(6):921-932.
- (9) Deptula P, Kylli P, Chamlagain B, Holm L, Kostianen R, Piironen V, Savijoki K, Varmanen P. 2015. BluB/CobT2 fusion enzyme activity reveals mechanisms responsible for production of active form of vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii*. *Microb. Cell Fact.* 14:186. Published online 2015 Nov 23. doi: 10.1186/s12934-015-0363-9.
- (10) Martens JH, Barg H, Warren MJ, Jahn D. 2002. Microbial production of vitamin B12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:275–285.
- (11) Taga ME, Larsen NA, Howard-Jones AR, Walsh CT, Walker GC. 2007. BluB cannibalizes flavin to form the lower ligand of vitamin B12. *Nature* 446:449–453.

- (12) Van Wyk J., Witthuhn R. C., Britz T. J. (2011). Optimisation of vitamin B₁₂ and folate production by *Propionibacterium freudenreichii* strains in kefir. *Int. Dairy J.* 21(2): 69–74.
- (13) Edelmann, M., Chamlagain, B., Santin, M., Kariluoto, S., Piironen, V., Stability of added and in situ-produced vitamin B₁₂ in breadmaking, *Food Chemistry* (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.071>
- (14) Gu Q, Zhang C, Song D, Li P, Zhu X. 2015 Aug 3. Enhancing vitamin B₁₂ content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*. *Int J Food Microbiol.* 206:56-9
Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.033
- (15) Taranto MP, Vera JL, Hugenholtz J, De Valdez GF, Sesma FJ. 2003 Sep. *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *Bacteriol.* 185(18):5643-7.
- (16) Bhushan B, Tomar SK, Chauhan A. 2017 Jan. Techno-functional differentiation of two vitamin B₁₂ producing *Lactobacillus plantarum* strains: an elucidation for diverse future use. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101(2):697-709.
- (17) De Angelis M, Bottacini F, Fosso B, Kelleher P, Calasso M, Di Cagno R, Ventura M, Picardi E, van Sinderen D, Gobbetti MP. 2014. *Lactobacillus rossiae*, a vitamin B₁₂ producer, represents a metabolically versatile species within the Genus *Lactobacillus*. *PLoS ONE* 9(9): e107232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107232>
- (18) S.A. SURVASE et al. 2006. Production of Vitamins. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (3) 381–396.
- (19) Aburjaile et al. 2016. Adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* to long-term survival under gradual nutritional shortage. *BMC Genomics* 2016 17:1007. doi:<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3367-x>
- (20) Marjorie G. Garrod et al. 2018. Vitamin B₁₂ added as a fortificant to flour retains high bioavailability when baked in bread .*Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*18. Available online 18 June 2018. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nimb.2018.05.042> .
- (21) British Standard . 2004. Sensory analysis — Methodology — Triangle test BS ISO 4120:2004(E).